



FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO EN QUÍMICA

TRABAJO FIN DE GRADO

CURSO ACADÉMICO [2016-2017]

TÍTULO:

**Nanomateriales en técnicas de extracción para análisis
químico**

AUTORA:

Laura Ortuño Hellín

RESUMEN

El presente trabajo presenta el desarrollo de un método para la determinación de compuestos farmacéuticos, en concreto antiinflamatorios no esteroideos, ya que su continua incorporación al medio ambiente hacen que exista una gran preocupación por sus posibles efectos.

Estos compuestos se determinan mediante la técnica de microextracción en fase sólida dispersiva magnética usando una zeolita modificada con óxido de hierro (ZSM-5/Fe₃O₂) como sorbente seguida de cromatografía de líquidos con detector ultravioleta-visible. Este método utiliza una técnica novedosa con muchas ventajas ya que consigue la miniaturización de la técnica de extracción en fase sólida dispersiva reduciéndose así el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos, además es una técnica rápida, fácil de usar y barata. La optimización del método se lleva a cabo mediante un diseño estadísticos de experimentos en el cual optimiza el valor óptimo para cada variable, siendo estas; el pH, volumen de eluyente, tiempo de extracción, tiempo de elución y fuerza iónica, posteriormente se realiza la validación del método, y finalmente se analizan muestras de agua de diferente procedencia.

Palabras clave: Antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs), microextracción en fase sólida dispersiva magnética, zeolitas, cromatografía de líquidos seguida acoplado a un detector de ultravioleta-visible.

ABSTRACT

The present work presents the development of a method for the determination of pharmaceutical compounds, specifically non-steroidal anti-inflammatory drugs, since their continuous incorporation into the environment causes a great concern due to its possible effects.

. These compounds are determined by the magnetic dispersive solid phase microextraction technique using an iron oxide modified zeolite (ZSM-5 / Fe_3O_2) as sorbent followed by liquid chromatography with ultraviolet-visible detector. This a recent technique with many advantages as it achieves the miniaturization of the technique of extraction in solid dispersive phase reducing the use of large amounts of organic solvents, besides it is a fast technique, easy to use and cheap. The optimization of the method is carried out by a statistical design of experiments in which optimizes the optimal value for each variable, these being; pH, eluent volume, extraction time, elution time and ionic force. After which the validation of the methods performed, finally water samples from different sources are analyzed.

Keywords: Nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs), magnetic dispersive solid phase microextraction, zeolites, liquid chromatography ultraviolet-visible.

Quiero dar las gracias a todos los que me han apoyado en la realización de este trabajo, especialmente a mi directora. La Dra. Lorena Vidal Martínez, y a mi compañera Paola Baile Pomares por ofrecerme su ayuda siempre que la he necesitado.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs)..... | 1 |
| 1.2. Técnicas de extracción en fase sólida (SPE)..... | 3 |
| 1.2.1. Tipo de sorbentes..... | 6 |
| 1.2.2. Zeolitas..... | 7 |
| 1.3. Diseño estadístico de experimentos..... | 9 |
| 1.3.1. Diseño factorial..... | 13 |
| 1.3.2. Diseño factorial fraccionado..... | 14 |
| 1.3.2.1. Diseño de Plackett-Burman..... | 15 |
| 2. OBJETIVO..... | 17 |
| 3. PARTE EXPERIMENTAL..... | 18 |
| 3.1. Reactivos..... | 18 |
| 3.2. Instrumentación y aparataje..... | 18 |
| 3.3. Herramientas estadísticas..... | 19 |
| 3.4. Síntesis del nanocompuesto..... | 19 |
| 3.4.1. Síntesis del nanocompuesto HDTMABr-ZSM-5/Fe ₂ O ₃ | 19 |
| 3.4.2. Modificación del nanocompuesto HDTMABr-ZSM-5/Fe ₂ O ₃ | 19 |
| 3.5. Microextracción en fase sólida dispersiva magnética..... | 20 |
| 3.6. Pruebas previas a la optimización de las condiciones de microextracción en fase sólida dispersiva magnética..... | 20 |
| 3.6.1. Efecto del modo de agitación..... | 20 |
| 3.6.2. Tipo de eluyente..... | 20 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 21 |
| 4.1. Optimización de las condiciones cromatográficas..... | 21 |
| 4.2. Pruebas previas a la optimización de las condiciones de microextracción en fase sólida dispersiva magnética..... | 22 |
| 4.2.1. Efecto del modo de agitación..... | 22 |
| 4.2.2. Tipo de eluyente..... | 23 |
| 4.3. Optimización de las condiciones de microextracción en fase sólida dispersiva magnética..... | 24 |
| 4.3.1. Etapa de cribado..... | 24 |
| 4.3.2. Etapa de optimización..... | 29 |

| | |
|---------------------------------|-----------|
| 4.4. Parámetros analíticos..... | 31 |
| 4.5. Muestras reales..... | 32 |
| 5. CONCLUSIÓN..... | 34 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA..... | 35 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema de los diferentes pasos del procedimiento de DMSPME..... | 6 |
| Figura 2. Estructura bidimensional de la zeolita | 8 |
| Figura 3. Estructura bidimensional de la zeolita ZSM-5 (a)y beta (b)..... | 8 |
| Figura 4. Modelo general de un proceso o sistema..... | 10 |
| Figura 5. Cromatograma de los distintos analitos a 225 nm..... | 21 |
| Figura 6. Cromatograma de los distintos analitos a 258 nm..... | 21 |
| Figura 7. Efecto del modo de la agitación. Las barras de error representan la desviación estándar de tres replicados..... | 22 |
| Figura 8. Efecto de los cuatro eluyentes. Las barras de error representan la desviación estándar de tres replicados | 23 |
| Figura 9. Gráfico de pareto para el KET obtenido con el diseño Plackett-Burman..... | 26 |
| Figura 10. Gráfico de pareto para el ABI obtenido con el diseño Plackett-Burman..... | 27 |
| Figura 11. Gráfico de pareto para el DIC obtenido con el diseño Plackett-Burman..... | 27 |
| Figura 12. Gráfico de pareto para el IBU obtenido con el diseño Plackett-Burman | 28 |
| Figura 13. Estudio de la fuerza iónica. Las barras de error representan la desviación estándar de tres replicados..... | 30 |
| Figura 14. Valor óptimo de la variable fuerza iónica..... | 31 |
| Figura 15. Rectas de calibrado de los analitos a diferentes longitudes de onda..... | 32 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Clasificación de los NSAIDs..... | 2 |
| Tabla 2. Propiedades y estructura de los NSAIDs..... | 3 |
| Tabla 3. Matriz experimentos del diseño Plackett-Burman..... | 16 |
| Tabla 4. Variables experimentales y niveles del diseño Plackett-Burman..... | 25 |
| Tabla 5. Plan de experimentos del diseño Plackett-Burman | 25 |
| Tabla 6. Datos obtenidos de las áreas de pico para el plan de experimentos..... | 26 |
| Tabla 7. Condiciones óptimas del proceso de extracción de los diferentes analitos.... | 29 |
| Tabla 8. Límites de detección y cuantificación para los analitos estudiados..... | 31 |
| Tabla 9. Recuperaciones relativas (%) de las muestras de agua..... | 33 |

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ACRÓNIMOS

| | |
|--|---|
| ABI | Felbinaco |
| ACN | Acetonitrilo |
| CE | Electroforesis capilar |
| COX | Ciclooxigenasa |
| CV | Coeficiente de variación |
| DIC | Diclofenaco |
| DMSPME | Microextracción en fase sólida dispersiva magnética |
| DSPE | Extracción en fase sólida dispersiva |
| DSPME | Microextracción en fase sólida dispersiva |
| EtOH | Etanol |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | Cloruro de hierro (III) hexahidratado |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | Sulfato de hierro (II) heptahidratado |
| GC | Cromatografía de gases |
| HDTMABr | Bromuro de hexadeciltrimetilamonio |
| HPLC | Cromatografía de líquidos de alta eficacia |
| H_3PO_4 | Ácido fosfórico |
| IBU | Ibuprofeno |
| KET | Ketoprofeno |
| KH_2PO_4 | Fosfato de potasio monobásico |
| K_2HPO_4 | Fosfato dipotásico |
| LC | Cromatografía de líquidos |
| LLE | Extracción líquido-líquido |
| LLME | Microextracción líquido-líquido |
| LOD | Límite de detección |
| LOQ | Límite de cuantificación |
| MeOH | Metanol |
| MNPs | Nanopartículas magnéticas |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NaOH | Hidróxido de sodio |

| | |
|----------------|---|
| NEWROD® | New Efficient Methodology fot Research Using Optimal Design |
| NSAIDs | Antiinflamatorios no esteroideos |
| R-COOH | Ácido carboxílico |
| SBME | Extracción mediante barra sorbente agitada |
| SPE | Extracción en fase sólida |
| SPME | Microextracción en fase sólida |
| t _R | Tiempo de retención |
| UV-VIS | Ultravioleta-visible |

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el creciente uso de fármacos tanto en humanos como en animales se está convirtiendo en un problema medioambiental. Los compuestos farmacéuticos ingeridos, pueden ser transformados en el interior del organismo a uno o más metabolitos y pueden ser excretados, ya sea como los compuestos originales, como sus metabolitos o como una mezcla de éstos. Tanto los fármacos como sus metabolitos al ser excretados pueden entrar en el sistema de alcantarillado a través de la orina y las heces.

Aunque la cantidad de productos farmacéuticos y sus metabolitos que entran en el medio ambiente posiblemente sea baja, su continua incorporación al medio podría ocasionar grandes acumulaciones en un futuro y provocar efectos adversos.¹

1.1. Antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs)

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) forman un grupo numeroso de fármacos principalmente analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos que comparten acciones terapéuticas y efectos adversos.² Los NSAIDs están indicados para el tratamiento de los procesos inflamatorios, y como terapia coadyuvante en el tratamiento del dolor.

Los NSAIDs inhiben la actividad de la enzima ciclo-oxigenasa (COX), produciendo la disminución de la formación de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico. La disminución en la síntesis de prostaglandinas y su importancia en la producción del dolor, inflamación y fiebre, y su actividad en diferentes tejidos es la responsable de la mayoría de los efectos terapéuticos, de diversas actividades fisiológicas, incluyendo la protección de mucosa gástrica.

Dicha enzima tiene dos isoformas, la COX-1 y la COX-2. La COX-1 tiene características de enzima constitutiva y su actividad tiene que ver con la participación de las prostaglandinas y los tromboxanos en el control de funciones fisiológicas, la COX-2 tiene características de enzima inducible en determinadas células bajo circunstancias patológicas por el concurso de diversas citoquinas y mediadores de la inflamación COX-2 las cuales se encuentran mayormente en tejido dañado o inflamado.^{2,3}

Introducción

Los NSAIDs se pueden clasificar en ácidos y no ácidos (Tabla 1).

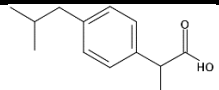
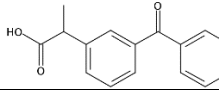
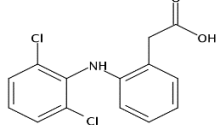
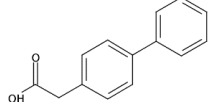
Tabla 1. Clasificación de los NSAIDs.

| NSAIDs | |
|--|--|
| Ácidos | No Ácidos |
| Salicílico Enólicos Acético Propiónico Antranílico Nicotínico | Sulfoanilidas Alcanonas Paraaminofenoles |

La característica estructural para la mayoría de los NSAIDs es su grupo ácido. El pKa de estas sustancias se encuentra entre 3 y 6, por lo cual a $\text{pH} \geq 7$ estos compuestos están presentes principalmente en forma aniónica.⁴ Los NSAIDs con carácter ácido poseen un centro ácido que puede ser representado por ácido carboxílico (R-COOH), además pueden tener también una función enólica. Si se esterifican los ácidos o se forman amidas de los ácidos carboxílicos, pueden ser hidrolizados metabólicamente y por ello ser activos. El centro de acidez está generalmente localizado en un átomo de C adyacente a una superficie plana como un anillo aromático o heteroaromático, la distancia entre estos centros es crítica debido a que si se aumenta en dos o tres carbonos la actividad disminuye. La sustitución por un metilo en el carbono que separa el centro aromático del ácido aumenta la actividad antiinflamatoria, si se sustituyen por grupos más numerosos en carbonos, disminuye la actividad, pero la incorporación del metilo como parte de un anillo alicíclico parece no afectar la actividad.

Este trabajo se centra en concreto en el ibuprofeno (ácido 4-isobutilfenil)- α -metilacético) (IBU), en el ketoprofeno (ácido 3-benzoil- α -metilbenzenoacético) (KET), en el diclofenaco (ácido 2-[2,6-diclorofenil]amino]benzenoacético) (DIC) y en el felbinaco (ácido bifenil-4-yl)acético) (ABI). Sus propiedades y estructuras se pueden ver en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades y estructuras de los NSAIDs.

| Compuestos | pK _a | Masa molecular (g/mol) | Fórmula molecular | Estructura |
|-------------|-----------------|------------------------|---|---|
| Ibuprofeno | 4,41 | 206,28 | C ₁₃ H ₁₈ O ₂ |  |
| Ketoprofeno | 4,23 | 254,28 | C ₁₆ H ₁₄ O ₃ |  |
| Diclofenaco | 4,18 | 296,15 | C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂ |  |
| Felbinaco | 4,29 | 212,24 | C ₁₄ H ₁₂ O ₂ |  |

1.2. Técnicas de extracción en fase sólida (SPE)

En los últimos años, el desarrollo de metodologías rápidas, precisas, exactas y sensibles se ha convertido en una cuestión importante. Ya que hay un alto grado creciente de contaminación en el medio ambiente como resultado de actividades humanas.^{5,6} La determinación de compuestos especialmente a niveles de traza sin una etapa de preconcentración previa es muy compleja debido a que la concentración de analitos en la mayoría de las muestras están generalmente alrededor del límite de detección de las técnicas más sensibles, y además hay altos niveles de interferencias de matriz. Por lo tanto, a pesar de los importantes avances en la instrumentación, éstos no permiten analizar muestras directamente. Estas son las razones por las que la preparación de la muestra antes del análisis instrumental es muy importante.^{7,8}

La preparación de la muestra es un paso esencial y debe ser llevada a cabo con detenimiento ya que puede causar la pérdida de analitos, introducir contaminación y errores, y por tanto, puede influir significativamente en el resultado final de la investigación.⁹ Es una etapa que se lleva la mayor parte del tiempo del estudio. Este paso incluye operaciones relacionadas con el muestreo, la conservación de la muestra, transporte, almacenamiento y aislamiento de analitos.⁹

Teniendo en cuenta los principios de la química verde, que es la base para la selección de nuevas técnicas para la preparación de muestras⁹, han ido surgiendo nuevas técnicas las cuales permiten el uso de cantidades más pequeñas de disolventes, eliminación de

interferentes, reducción de muestra, de tiempo y de energía. Además de ser técnicas rápidas, fáciles de usar, baratas y ecológicas permiten acondicionar las muestras.

La introducción del uso de adsorbentes para purificar y extraer los analitos en disolución significó un gran avance. La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica de preparación de muestra más ampliamente utilizada para las muestras ambientales. Esta técnica fue desarrollada por primera vez en la década de 1980, y desde entonces ha demostrado ser una herramienta importante ya que permite aislar, purificar y preconcentrar con éxito compuestos químicos de manera rápida y reproducible.⁸

La SPE mediante el uso de adsorbentes es idónea para la extracción de analitos presentes en muestras líquidas y para la purificación de los extractos obtenidos a partir de muestras sólidas mediante distintas técnicas de extracción. En esta metodología el disolvente compite con los analitos por los sitios activos de adsorción del sorbente. De este modo, mediante una adecuada selección de disolventes empleados es posible la eliminación de compuestos interferentes del sorbente para después, utilizando un disolvente de diferente polaridad, eluir los analitos. Existen diferentes tipos de cartuchos con distintos adsorbentes, siendo posible el empleo de adsorbentes polares, no polares y de intercambio iónico, cuya elección depende del tipo de matriz, analitos de interés e interferentes.¹⁰

En respuesta a las actuales demandas de información química, a las exigencias económicas y medioambientales y las deficiencias de los métodos tradicionales, la Química Analítica ha incorporado a sus procesos de medida las tres tendencias básicas de la disciplina: automatización, miniaturización y simplificación. En este sentido, han surgido gran variedad de técnicas de microextracción tanto en fase sólida (SPME) como en fase líquida (LPME) que ofrecen una alternativa a las clásicas SPE y extracción líquido-líquido (LLE), adecuándose a las actuales exigencias.¹¹

Para solventar estos inconvenientes, a principios de los años 90 se introdujo la SPME, técnica de separación propuesta por Pawliszyn como una alternativa a las limitaciones de la SPE convencional. Entre sus ventajas se puede mencionar: (i) no requiere disolventes orgánicos para el proceso de extracción; (ii) es simple ya que integra el proceso de extracción e inyección en un mismo dispositivo; (iii) no requiere grandes volúmenes de muestra; (iv) su manejo es cómodo y fácilmente acoplable a diversos sistemas instrumentales como cromatografía de gases (GC), cromatografía de líquidos de alta

resolución (HPLC) o electroforesis capilar (CE); (v) es fácilmente automatizable e incluso se encuentra integrado a equipos instrumentales comerciales.^{8,11}

La SPME presenta distintas modalidades, cada una de ellas se clasifica dependiendo de cómo se ha llevado la difusión; difusión conseguida por agitación y difusión conseguida por el paso de un flujo a través de la fibra. Las principales modalidades dentro de la difusión por agitación son: (a) SPME en fibra, (b) extracción mediante barra sorbente agitada (SBSE), (c) SPME dispersiva (DSPME). Las principales modalidades de SPME en las cuales se lleva a cabo la difusión mediante flujo a través son: (a) SPME en punta de pipeta, (b) SPME en jeringa, (c) SPME en tubo.^{12, 13}

La técnica SPME en fibra fue el primer dispositivo utilizado en el cual la fibra se compone de un capilar de sílice fundida (generalmente de 1 cm de longitud y 0,1 mm de diámetro interno), químicamente inerte y térmicamente estable, que se encuentra recubierto de un pequeño volumen de un polímero sorbente (menos de 1 μ L). Esta fibra se sitúa en el interior de un dispositivo de extracción que permite exponer la fibra a la muestra que contiene los analitos. Tras la extracción de los analitos, la fibra se retorna al dispositivo de extracción que permite finalmente la inyección de los analitos, sin pérdidas significativas, en el sistema de medida.¹¹

La SBSE se basa en el uso de una pequeña barra magnética agitada recubierta de un polímero que actúa de adsorbente. En esta técnica se introduce la barra magnética en una matriz líquida donde se agita durante un tiempo, reteniendo en el material sorbente a los analitos. Finalmente, éstos se desorben con un disolvente o térmicamente en una unidad de desorción (150-300 °C) para su determinación por GC o HPLC.⁴

DSPME es una técnica de preparación de muestra desarrollada con una modificación simple miniaturizada de la técnica DSPE introducida por Anastassiades en 2003¹⁴. Se basa en la dispersión de micro o nanosorbentes en una muestra y aislamiento del sorbente por centrifugación o filtración. Los analitos pueden ser desorbidos usando el disolvente adecuado o temperatura. La principal diferencia con la técnica de DSPE es la cantidad de sorbente utilizado que no debe superar los 100 mg el cual se dispersa en la muestra que contiene los analitos. El fenómeno de dispersión permite al sorbente interactuar rápido y uniformemente con todos los analitos lo cual conduce a mejorar la precisión del método y a reducir el tiempo de extracción.^{5,8,15}

Introducción

Las nanopartículas magnéticas han sido y están siendo ampliamente utilizadas en técnicas de extracción. En particular, la aplicación de sorbentes magnéticos para DSPE o DSPME fue desarrollada por Towler en 1996. La disponibilidad de estas nanopartículas ha permitido el desarrollo de la microextracción en fase sólida dispersiva magnética (DMSPME) que es un tipo de DSPME que implica el uso de un nanosorbente magnético dispersado uniformemente en la muestra (Figura 1a). Los analitos se adsorben sobre el nanosorbente mediante agitación (Figura 1b), que se recupera de la disolución usando un campo magnético (Figura 1c). Una vez recuperado el nanosorbente con los analitos se elimina la disolución (Figura 1d). Posteriormente, la fase magnética se dispersa en el disolvente de elución (Figura 1e), después de la elución de los analitos del nanosorbente el imán se utiliza de nuevo para separar el nanosorbente de la solución (Figura 1f). En algunos casos, las etapas de extracción o elución están asistidas por ultrasonidos o agitación con vórtex, entre otros.

La enorme aplicación de esta técnica se debe principalmente a su elevado factor de preconcentración, simplicidad, gran relación de área superficial del nanosorbente, acorta el tiempo de extracción y evita el paso de centrifugación o filtración requerido en DSPME.^{8,16}

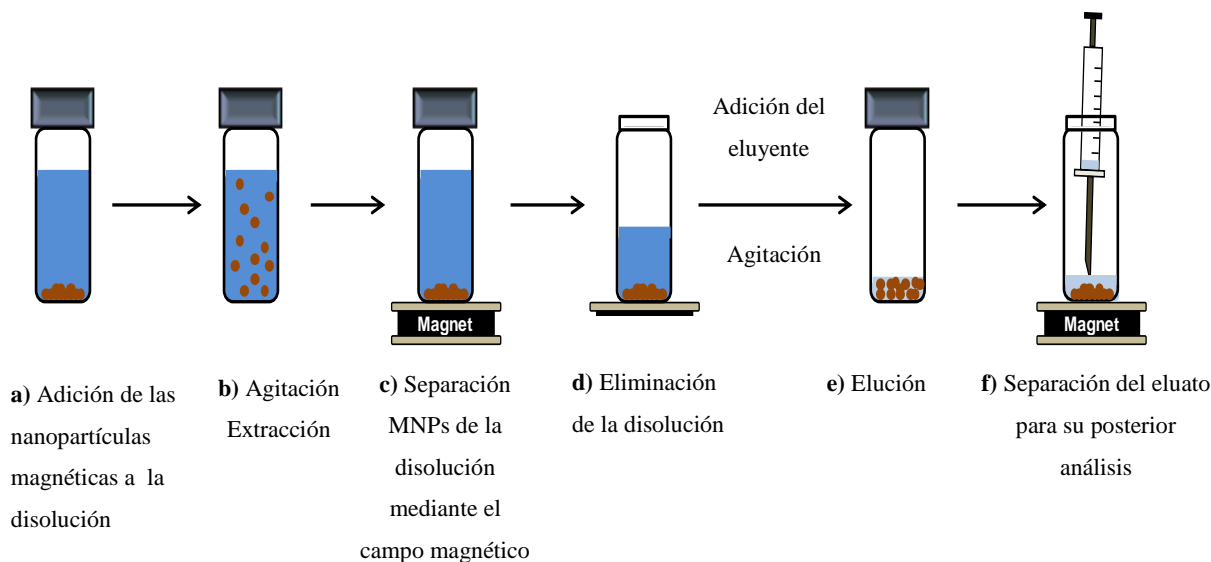


Figura 1. Esquema de los diferentes pasos del procedimiento de DMSPME.

1.2.1. Tipo de sorbentes

La selectividad de una extracción está relacionada con la capacidad del sorbente de discriminar entre los analitos de interés y los demás compuestos de la matriz. Por lo tanto,

las propiedades del adsorbente estarán relacionadas e implicadas con la estructura química del analito y la composición de la matriz de la muestra.¹⁷

Los materiales utilizados en SPME tienen en común una estructura tridimensional rígida y porosa, con una elevada área superficial. Los más comúnmente utilizados son sílice y resinas poliméricas, los cuales pueden modificarse mediante la introducción de diferentes grupos funcionales. También existen los denominados adsorbentes de acceso restringido, que permite únicamente el paso de moléculas pequeñas. Además, en los últimos años se han introducido otro tipo de adsorbentes que permiten una elevada selectividad en la extracción.

Hoy en día, varios nanomateriales comerciales o sintéticos incluyendo sílice funcionalizada, nanotubos de carbono, óxidos de grafeno, zeolitas y nanofibras se han aplicado como sorbentes en DSPME. Estos nanomateriales pueden usarse para la especiación, enriquecimiento y separación de varios analitos de diferentes matrices. El elevado valor de área superficial de estos nanomateriales aumenta la cinética de la extracción, además de una amplia variedad en la aplicabilidad de diversos problemas. La modificación de estos nanomateriales con nanopartículas magnéticas (MNPs) permite facilitar su manejo y evitar el uso posterior de centrifugaciones o filtraciones.⁵

1.2.2. Zeolitas

Durante las últimas décadas, numerosos científicos y técnicos han dedicado especial atención a un grupo de aluminosilicatos cristalinos con gran porosidad, conocidos por el nombre de zeolitas, llevando a cabo una labor investigadora sobre su síntesis, estructura y propiedades.

Aunque la difusión de las zeolitas ha tenido lugar en los últimos cuarenta años, el descubrimiento de zeolitas naturales fue en 1756, cuando el geólogo A. Cronstedt observó que ciertos minerales, como la estilbita, al ser calentados fundían y hervían al mismo tiempo, y al enfriarse se hidrataba de nuevo, este mineral tenía la propiedad de la desorción reversible del agua, por los que se les denominó zeolitas (del griego “zeo” hervir y “lithos” piedra).¹⁸

Las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos microporosos, que pertenecen a la familia de los tectosilicatos. Las zeolitas tienen una estructura molecular formada por SiO_4 y AlO_4^- con átomos de oxígeno que conectan los tetraedros vecinos (Figura 2). Éstas pueden considerarse como armazones de sílice pura con Si^{4+} sustituido por Al^{3+} ; cuando los

átomos de Al se incorporan en la estructura genera una carga negativa, que es compensada por cationes situados dentro de los poros y canales.^{18,19,20}

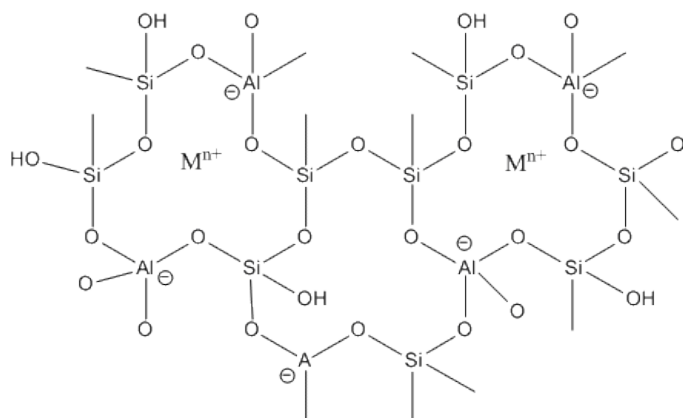


Figura 2. Estructura bidimensional de la zeolita.

La estructura de la zeolita como se puede ver en la Figura anterior se compone de tres componentes: el armazón de aluminosilicato [$\text{Al}_x\text{Si}_{1-x}\text{O}_2$], los cationes intercambiables ($\text{M}_{x/n}^{n+}$) y el agua zeolítica ($y\text{H}_2\text{O}$), donde x puede variar de 0-0.5, y representa el número de moléculas de agua y M son los cationes que pueden ser tanto inorgánico como orgánicos. Estos cationes pueden ser intercambiados, por lo tanto, zeolitas tienen propiedades de intercambio iónico.¹⁸

Las zeolitas existen como minerales naturales y en formas sintéticas (e.g., ZSM-5, beta) mostradas en la Figura 3a y 3b. En 1948, Milton comenzó a trabajar su síntesis, sintetizándose gran número de ellas, como las zeolitas A y X. Hoy en día, casi 200 estructuras diferentes son conocidas; todas estas estructuras han sido reconocidas por la Comisión de Estructura de la Asociación Internacional de Zeolita.²¹

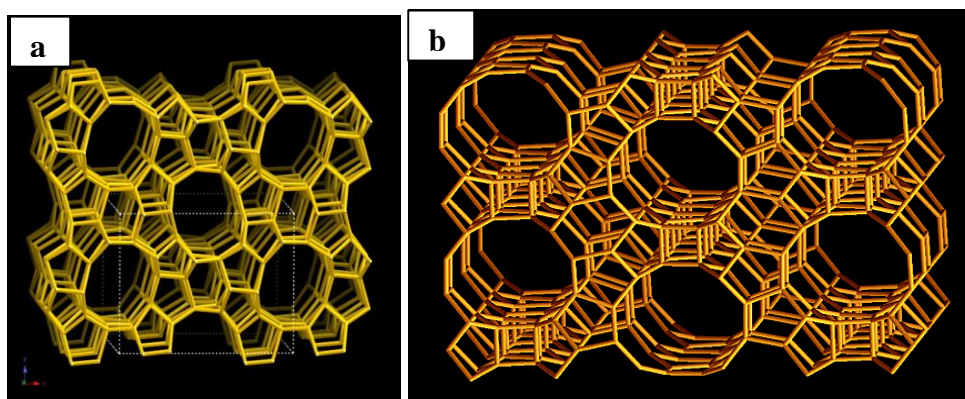


Figura 3. Estructura zeolita ZSM-5 (a) y beta (b).

Las zeolitas tienen diferentes tamaños de poros por ello, tienen la capacidad de discriminar moléculas con diferentes dimensiones, por esta razón las zeolitas se conocen también como tamices moleculares.¹⁸

Las propiedades más importantes de las zeolitas son acción catalítica, superficie elevada, alta capacidad de adsorción y selectividad molecular, muy buena estabilidad térmica, buen poder de separación y purificación, elevada hidrofobicidad y acidez. Todas estas propiedades se deben a sus estructuras microporosas ordenadas.^{18,19,20}

Las zeolitas modificadas magnéticamente son excelentes candidatas para la separación ya que se espera que su capacidad de adsorción sea elevada debido a su gran área superficial; posee propiedades magnéticas y baja toxicidad; lo que significa que éstas puedan separarse fácilmente de la disolución a través de un campo magnético externo. Estas han sido utilizadas como sorbentes para la determinación de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos en muestras de agua.²²

1.3. Diseño estadístico de experimentos

El diseño estadístico de experimentos, también denominado como diseño experimental, es el proceso de planear un experimento para obtener datos apropiados, que pueden ser analizados mediante métodos estadísticos, con objeto de producir conclusiones válidas y objetivas.²³ Se requiere de un enfoque estadístico del diseño de experimentos para obtener conclusiones significativas a partir de datos experimentales. La metodología estadística es el único enfoque objetivo para analizar un problema que involucre datos sujetos a errores experimentales. De modo que hay dos aspectos en cualquier problema experimental: el diseño del experimento y el análisis estadístico de los datos. Estos dos temas están estrechamente relacionados, ya que el método de análisis depende directamente del diseño empleado.

El diseño experimental ayuda al experimentador a seleccionar la estrategia experimental óptima, que permita obtener la información buscada con el mínimo coste y evaluar los resultados experimentales obtenidos, garantizando la máxima fiabilidad en las conclusiones que se obtengan.

Las situaciones en las que se puede aplicar el diseño experimental son muy numerosas. De forma general, se aplica a sistemas como el mostrado esquemáticamente en la Figura 4.

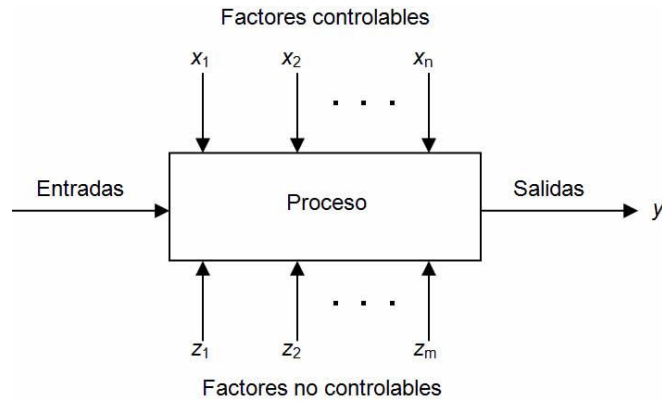


Figura 4. Modelo general de un proceso o sistema.

En todos los sistemas se observan una o más variables experimentales dependientes o respuestas (y) cuyo valor depende de los valores de una o más variables independientes controlables llamadas también factores (x). Las respuestas, además, pueden estar influidas por otras variables que no son controladas por el experimentador (z).

La optimización mediante diseño experimental se presenta como alternativa a la optimización clásica (paso a paso), en la que los inconvenientes provienen de variar un factor cada vez. El método clásico de optimización es clasificado como un método secuencial, y es también conocido como método clásico de investigación, método del factor único o de estrategia de un-factor-por-vez. El elevado coste de la experimentación y las limitaciones de tiempo obligan a ejecutar sólo los experimentos imprescindibles, y el método tradicional de variar un factor cada vez no suele ser la mejor opción. Esta estrategia de experimentación puede implicar más experimentos de los necesarios y, a pesar de ello, proporcionar sólo información parcial, no se mostrará si existe interacción entre factores. Las interacciones suelen ser muy corrientes y a veces son los efectos más importantes, por lo que conocerlas es imprescindible para comprender el comportamiento de muchos sistemas. En este método experimental se fijan a un determinado nivel o valor todos los factores que están siendo investigados menos uno de ellos. Entonces, éste último es variado hasta que se encuentre la mejor respuesta. Después de eso, este factor es fijado y un nuevo factor es variado dentro de un intervalo prefijado. Al finalizar el proceso se obtiene un conjunto de valores para cada factor, dentro del cual se encuentra el óptimo, pero el proceso es largo, tedioso y presenta los inconvenientes arriba indicados.

La solución, por lo tanto, debe consistir en variar más de un factor simultáneamente al realizar un nuevo experimento. Ello permite mejorar la eficiencia del esfuerzo del experimentador, y obtener información sobre las interacciones. La dificultad principal consiste en diseñar una experimentación reducida donde estos cambios simultáneos se

complementen entre sí y permitan obtener la información buscada al combinar los resultados de todos los experimentos. El diseño estadístico de experimentos proporciona el marco matemático para cambiar todos los factores simultáneamente y obtener la información buscada con un número reducido de experimentos, es decir, con la máxima eficiencia. El diseño experimental conduce a una planificación con menos experimentos que el método de optimización paso a paso para obtener un conocimiento mayor del sistema o proceso.

La aplicación del diseño de experimentos requiere tener una idea clara de qué es exactamente lo que se va a estudiar, cómo se van a recopilar los datos y, al menos, una idea cualitativa de cómo se van a analizar. Por ello, se requiere considerar las etapas que se enumeran a continuación:

1) Comprender el problema y definir claramente el objetivo

El diseño de experimentos es una herramienta para encontrar respuestas a problemas perfectamente identificados y especificados. Cuanto más claramente se plantea el problema y se identifica el propósito o información que se desea conseguir con los experimentos, mayor puede ser la ayuda del diseño. Para obtener una comprensión profunda del sistema y del problema, es necesario recopilar toda la información disponible sobre el sistema en estudio que pueda ser relevante para la experimentación que se realizará.

2) Identificar los factores y niveles

Es muy importante identificar y apuntar todos los factores (las variables independientes) que se cree que pueden tener influencia en el proceso y en la respuesta, aunque se crea que pueden tener poca importancia. Los factores no controlados pueden introducir variaciones en la respuesta que dificultan el análisis de los resultados experimentales. El experimentador debe elegir los factores que variarán en el experimento, los intervalos de dicha variación y los niveles específicos a los cuales se hará el experimento. Tal conocimiento suele ser una combinación de experiencia práctica y comprensión teórica. Es importante investigar todos los factores que pueden ser de interés, y no depender demasiado de la experiencia pasada; en particular durante las primeras etapas de la experimentación o cuando el proceso no está muy avanzado.

Cuando el objetivo es el escrutinio de factores o la caracterización del proceso, suele ser mejor mantener bajo el número de niveles de los factores (lo más común es usar dos niveles).

3) Selección de la variable respuesta

Al seleccionar la respuesta o variable dependiente, el experimentador debe estar seguro de que la respuesta que se va a medir realmente provee información útil acerca del proceso de estudio. Con mayor frecuencia, el promedio o la desviación estándar (o ambos) de la característica medida serán la variable de respuesta. No son raras las respuestas múltiples. La capacidad de medición (o el error de medición) también es un factor importante. Si la capacidad de medición es deficiente, sólo puede esperarse que el experimento detecte efectos relativamente grandes de los factores; en caso contrario deben hacerse repeticiones.

4) Elección del diseño experimental

Si los tres pasos anteriores se han seguido de manera correcta, este cuarto paso es relativamente fácil. Para elegir el diseño es necesario considerar el tamaño muestral (número de repeticiones), seleccionar un orden adecuado para los ensayos experimentales, y determinar si hay implicado bloqueo u otras restricciones de aleatorización. Es importante tener presente los objetivos experimentales al seleccionar el diseño. En muchos experimentos se sabe de antemano que algunos factores producen respuestas diferentes. Consecuentemente, hay interés en identificar qué factores causan esta diferencia y estimar la magnitud del cambio de la respuesta. En otras situaciones habrá más interés en verificar la uniformidad.

5) Realización de la experimentación

El diseño experimental escogido suele estar descrito mediante variables codificadas. Éstas se particularizan para los factores en estudio, se comprueba si los experimentos son posibles y, si es así, se realiza la experimentación en orden aleatorio respecto al orden en el cual están listados. La ejecución en orden aleatorio es necesaria para asegurar que los factores no contemplados introduzcan confusión y sesgo en los resultados. Además, es vital vigilar el proceso cuidadosamente para asegurar que todo se haga conforme a lo planeado. En esta fase, los errores en el procedimiento suelen anular la validez experimental.

6) Análisis de datos

Deben emplearse métodos estadísticos para analizar los datos, de modo que los resultados y conclusiones sean objetivos más que apreciativos. Si el experimento se diseñó correctamente y si se ha realizado conforme al diseño, los métodos estadísticos que se requieren no son complicados. Existen muchos paquetes de software excelentes

para el análisis de datos, y varios métodos gráficos sencillos son importantes en la interpretación de tales datos. El análisis de residuos y la verificación de la idoneidad del modelo son también técnicas de análisis de gran utilidad.

Hay que recordar que los métodos estadísticos no pueden probar que un factor (o varios factores) tiene un efecto particular. Sólo proporcionan directrices para la veracidad y validez de los resultados. Los métodos estadísticos, aplicados adecuadamente, no permiten probar algo experimental, sólo hacen posible obtener el probable error de una conclusión, o asignar un nivel de confiabilidad a los resultados.

La principal ventaja de los métodos estadísticos es que agregan objetividad al proceso de toma de decisiones. Las técnicas estadísticas, aunadas a un buen conocimiento técnico o del proceso y al sentido común, suelen llevar a conclusiones razonables.

7) Conclusiones y recomendaciones

Una vez que se han analizado los datos, el experimentador debe extraer conclusiones prácticas de los resultados y recomendar un curso de acción. También debe realizarse un seguimiento y pruebas de confirmación para validar las conclusiones del experimento.

Existen numerosos tipos de diseños experimentales dependiendo de las aplicaciones. Los que aquí se presentan, son los diseños utilizados en la presente memoria.

1.3.1. Diseño factorial

Por diseño factorial se entiende aquel en el que se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en cada ensayo completo o réplica del experimento.²³ Los diseños factoriales son los más eficientes para estudiar los efectos producidos por dos o más factores, los cuales tienen dos o más niveles (la notificación más habitual para los factores por lo general es el valor -1 para el extremo inferior y el valor +1 para el extremo superior del experimento). Estos factores se estudian porque, en principio, se piensa que tienen un efecto conjunto de éstos sobre la respuesta. El efecto de un factor se define como el cambio en la variable respuesta producido por un cambio en el nivel del factor.

Existen varios casos especiales del diseño factorial general que resultan importantes, porque se usan ampliamente en el trabajo de investigación y, además, éstos constituyen la base para otros diseños de gran valor práctico. El caso más importante es el diseño factorial completo 2^k , en el cual se tienen k factores con dos niveles cada uno (superior e inferior). Debido a que sólo hay dos niveles para cada factor se debe suponer que la

respuesta es aproximadamente lineal en el intervalo de los niveles elegidos de los factores. El modelo estadístico de diseño 2^k describe los experimentos más adecuados para conocer simultáneamente qué efecto tienen k factores sobre una respuesta y descubrir si interaccionan entre ellos. Sin embargo, incluso para un número pequeño de factores, el número de combinaciones ó tratamientos en un diseño 2^k es grande.

Muchas veces no se cuenta con los recursos necesarios para llevar a cabo el experimento frecuentemente, o no se tiene tiempo para llevarlo a cabo una segunda vez, por lo que el investigador se ve en la necesidad de realizar el experimento una sola ocasión. A este tipo de diseño factorial 2^k se le llama factorial no replicado. Los diseños factoriales presentan varias ventajas. Son más eficaces que los experimentos en los cuales se varía solo un factor, ya que permiten obtener más información con el menor número de experimentos posible. Además, un diseño factorial es necesario cuando hay presentes interacciones, para evitar conclusiones engañosas. Finalmente, estos diseños permiten estimar los efectos de un factor a varios niveles de los otros factores, así como interacciones entre dichos factores, aportando conclusiones que son válidas en un intervalo de condiciones experimentales.

1.3.2. Diseño factorial fraccionado

A medida que el número de factores en un diseño factorial 2^k aumenta, el número de ensayos necesarios para obtener una réplica completa sobrepasa rápidamente los recursos de la mayoría de los experimentadores. Una réplica completa de un diseño 2^6 requiere 64 ensayos. En este caso sólo 6 de los 63 grados de libertad corresponden a los efectos principales, y únicamente 15 corresponden a las interacciones de dos factores. Los 42 restantes corresponden a las interacciones de tres o más factores.

Si el experimentador puede suponer razonablemente que algunas interacciones de orden superior son despreciables, la información sobre los efectos principales y las interacciones de menor orden puede obtenerse realizando sólo una fracción del experimento factorial completo. Estos diseños factoriales fraccionados²³ se encuentran entre los tipos más ampliamente usados para el diseño de productos y procesos y para la detección y solución de problemas.

Un uso importante de este tipo de diseño se da en los experimentos de escrutinio, también llamados de tamizado, cribado o “*screening*”. Estos son experimentos en los cuales se consideran muchos factores con el fin de identificar aquellos que tienen efectos

importantes, de haberlos. Los experimentos de escrutinio suelen realizarse en las primeras fases de un proyecto o experimento cuando es probable que muchos de los factores inicialmente considerados tengan poco o ningún efecto sobre la respuesta. Los factores que se identifican como importantes se investigan entonces con mayor detalle en experimentos posteriores.

Los diseños factoriales fraccionados se denotan como 2^{k-p} , donde se estudian k factores con 2^{k-p} experimentos. El diseño factorial fraccionado más utilizado es el conocido como Plackett-Burman, un diseño saturado y que principalmente es utilizado para identificar las variables significativas del proceso.

1.3.2.1. Diseño de Plackett-Burman

Estos diseños, atribuidos a Plackett y Burman (1946)^{23,24}, son diseños factoriales fraccionados de dos niveles (± 1), utilizados para estudiar $k = N-1$ factores en N ensayos, en donde N es múltiplo de 4. Este tipo de diseño es útil cuando $N = 8, 12, 20, 24, 28$ y 36 .

Este diseño asume que las interacciones pueden ser ignoradas y que únicamente los efectos principales son calculados con un número reducido de experimentos. Se emplea cuando se quiere conocer cuál de los factores son significativos en el proceso, y cuál afecta en menor grado, y por lo tanto puede ser fijado. Posteriormente los factores que afectan significativamente al proceso, son optimizados mediante un diseño factorial completo u otro tipo de diseño, como el de superficie de respuesta.

En la presente memoria, en primer lugar, se realizó una etapa de cribado para hallar aquellas variables cuya modificación ocasionaba cambios significativos en la respuesta del sistema, en la Tabla 3 se muestra la matriz de experimentos del diseño Plackett-Burman estudiada. Posteriormente, se optimizó la variable significativa y se halló las mejores condiciones para la microextracción.

Tabla 3. Matriz experimentos del diseño Plackett-Burman.

| Nº Exp | b1 | b2 | b3 | b4 | b5 |
|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | +1 | +1 | -1 | +1 | +1 |
| 2 | -1 | +1 | +1 | -1 | +1 |
| 3 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 |
| 4 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 |
| 5 | -1 | -1 | +1 | -1 | +1 |
| 6 | -1 | -1 | -1 | +1 | -1 |
| 7 | +1 | -1 | -1 | -1 | +1 |
| 8 | +1 | +1 | -1 | -1 | -1 |
| 9 | +1 | +1 | +1 | -1 | -1 |
| 10 | -1 | +1 | +1 | +1 | -1 |
| 11 | +1 | -1 | +1 | +1 | +1 |
| 12 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |

2. OBJETIVO

El objetivo principal del presente trabajo ha sido desarrollar un método para determinar NSAIDs (ibuprofeno, diclofenaco, ketoprofeno y felbinaco) en muestras de agua mediante microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de líquidos (LC) con detección UV-VIS. Para ello se utilizará en la etapa de preparación de la muestra la técnica de microextracción en fase sólida dispersiva magnética, usando como sorbente el nanocompuesto de zeolita ZSM-5 decorado con nanopartículas de óxido de hierro (ZSM-5/Fe₂O₃) y modificada con el surfactante bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMABr). La optimización de la extracción se ha llevado a cabo mediante un diseño estadístico de experimentos (i.e., Plackett-Burman). La etapa de separación se lleva a cabo mediante LC con detección por UV-VIS.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos

Las disoluciones patrón de cada uno de los analitos a una concentración de 1000 mg L⁻¹ se prepararon en metanol. Una vez preparadas se almacenaron en viales ámbar a 4°C. Los reactivos utilizados fueron: ibuprofeno, diclofenaco, ketoprofeno y felbinaco suministradas por Sigma-Aldrich (Madrid, España). Las diferentes disoluciones de trabajo se prepararon diluyendo las disoluciones patrón en agua desionizada.

Los reactivos utilizados para la síntesis de la zeolita magnética fueron: zeolita suministrada por Zeolyst International (Kansas City, EEUU), FeCl₃·6H₂O y FeSO₄·7H₂O suministradas por Sigma-Aldrich; e hidróxido de sodio (NaOH 5M) con una pureza del 99% suministrada por ACS Scharlau (Sentmenat, España).

Para la modificación de la zeolita magnética los reactivos empleados fueron bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMABr) de la casa Sigma-Aldrich y etanol (EtOH) con una pureza del 96% suministrado por Panreac (Barcelona, España).

Para la preparación de la fase móvil se utilizó KH₂PO₄ el cual fue suministrado por Merck (Darmstadt, Germany), y acetonitrilo (ACN) grado-HPLC con un grado de pureza del 99% de la casa Sigma-Aldrich. Para la preparación de la disolución de KH₂PO₄ 0,01 M se utilizó agua ultrapura Milli-Q.

Otros reactivos utilizados fueron: cloruro sódico (NaCl) con una pureza del 99% y ácido fosfórico (H₃PO₄) con una pureza del 85% suministrados por ACS Scharlau; y K₂HPO₄ con una pureza del 99% suministrado por Merck.

Cabe comentar que las disoluciones de trabajo se ajustaron a pH 3,2 con tampón H₃PO₄/ KH₂PO₄ 0,001 M (pK_a= 2,1) y NaOH 0,1 M. En cambio, para las disoluciones de pH 7 se ajustaron con tampón KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,0025 M (pK_a= 7,2) y 0,1 M H₃PO₄.

3.2. Instrumentación y aparataje

Para llevar a cabo la técnica de DMSPME se utilizó un imán de neodimio recubierto de Ni, grado N45, dimensiones 45 x 30 mm de Supermagnete (Gottmadinge, Alemania) como campo magnético externo, una placa magnética agitadora de la casa Darlab Egara (Terrasa, España) y un ultrasonidos S 30 H suministrado por Elma Schmidbauer GmbH (Singen, Alemania). La estufa y la mufla que se utilizó para la síntesis del nanocompuesto fue suministrada por la casa JP Selecta (Barcelona, España).

Los análisis cromatográficos se realizaron mediante un sistema de cromatografía de líquidos (LC) de la casa Shimadzu LC-20AT (Kyoto, Japón) acoplado a un detector Shimadzu SPD-10A UV-VIS, equipado con una columna kinetex C₁₈ (5 µm diámetro de partícula, 4,6 mm de diámetro interno x 150 mm de longitud) (Torrance, EE.UU.). Se empleó una mezcla tampón fosfato (0,01M a pH 4,2)/acetonitrilo (50:50, v/v) como fase móvil a un flujo de 1 mL min⁻¹. El volumen de inyección fue de 20 µL.

3.3. Herramientas estadísticas

Se realizó un diseño de experimentos para hallar las condiciones óptimas del proceso de microextracción. El programa NEWROD® (“New Efficient Methodology for Research Using Optimal Design”) (LPRAI, Marsella, Francia 2000) fue empleado para construir las matrices de los diseños y evaluar los resultados obtenidos. El área de pico de cada analito fue elegida como función respuesta.

3.4. Síntesis del nanocompuesto

3.4.1. Síntesis del nanocompuesto HDTMABr-ZSM-5/Fe₂O₃

El compuesto se preparó a partir de una suspensión de 1 g de zeolita ZSM-5 en 200 mL de una disolución acuosa FeCl₃·6H₂O (0,778 g) y FeSO₄·7 H₂O (0,400 g). Después se añadieron gota a gota 5 mL de una disolución de NaOH 5 M previamente preparada, para precipitar el óxido de hierro. La mezcla se agitó mediante una placa magnética agitadora durante 2 horas a temperatura ambiente.

El nanocompuesto resultante, ZSM-5/Fe₂O₃ se lavó 4 veces con agua desionizada, utilizando un imán de neodimio para separar el material magnético del no magnético. El compuesto se trasvasó a un crisol y se secó durante toda la noche a 130°C. Posteriormente se sacó de la estufa y se volvió a lavar hasta observar aguas de lavado claras y pH neutro, y se secaron de nuevo en la estufa a una temperatura de 130 °C. Una vez seca se calcinó en una mufla durante 2 horas a una temperatura de 380 °C para eliminar el agua y los componentes volátiles.

3.4.2. Modificación del nanocompuesto HDTMABr-ZSM-5/Fe₂O₃

Para la modificación de la zeolita se preparó una disolución de surfactante al 0,5% (w/v) en una mezcla de agua desionizada/EtOH. Se mezcló la disolución de surfactante

con la zeolita y se agitó en placa agitadora magnética durante 24 horas a temperatura ambiente.

Una vez pasadas las 24 horas, el nanocompuesto resultante ZSM-5/Fe₂O₃ modificado con bromuro de hexadeciltrimetil amonio (HDTMABr-ZSM-5/Fe₂O₃) fue filtrado sobre un embudo büchner conectado a una bomba de vacío y lavado con agua desionizada cuatro veces. A continuación, se dejó secar en estufa 3 horas a 130 °C. Finalmente se molió en un mortero y fue almacenado.

3.5. Microextracción en fase sólida dispersiva magnética

En primer lugar, se pusieron 50 mg del nanocompuesto HDTMABr-ZSM-5/Fe₂O₃ en un vial de vidrio (volumen 25 mL) y se añadieron junto con 20 mL de patrón. La mezcla se agitó manualmente durante 10 min. Una vez transcurridos los 10 min y con ayuda del imán de neodimio se separa la fase acuosa del sorbente y se elimina la fase acuosa con una pipeta de vidrio. A continuación, se llevó a cabo la elución añadiendo 0,5 mL de metanol (MeOH) usando un baño de ultrasonidos durante 2 min. Por último, el eluato fue separado del nanocompuesto con ayuda del campo magnético externo retirado con una jeringa, filtrado con filtros de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro, y transferido a un vial (volumen 2 mL). Finalmente, una alícuota de 20 µL del eluato es inyectada en el sistema cromatográfico para su separación y cuantificación.

3.6. Pruebas previas a la optimización de las condiciones de microextracción en fase sólida dispersiva magnética

3.6.1. Efecto del modo de agitación.

Se estudió el efecto de la agitación sobre el proceso de microextracción. Para ello se realizaron varias extracciones de una disolución patrón de 500 µg L⁻¹ de NSAIDs. Se hicieron extracciones agitando 10 min manualmente y extracciones agitando 10 min con Vortex.

3.6.2. Tipo de eluyente

Otro efecto que se estudió fue el tipo de eluyente; se realizaron varias extracciones con diferentes tipos de eluyente siendo estos acetona, EtOH, MeOH y ACN. Para ello se realizaron extracciones de patrones acuosos dopados a 500 µg L⁻¹ por cada eluyente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización de las condiciones cromatográficas

En la optimización de las condiciones cromatográficas se estudió la longitud de onda seleccionada para la detección de los analitos mediante UV-VIS. La fase móvil y el flujo se optimizó en trabajos previos.

Se realizó el estudio de la señal obtenida a dos longitudes de onda: 225 y 258 nm. Para ello se realizó una extracción de un patrón de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ y se estudió a las dos longitudes de ondas (Figura 5 y Figura 6).

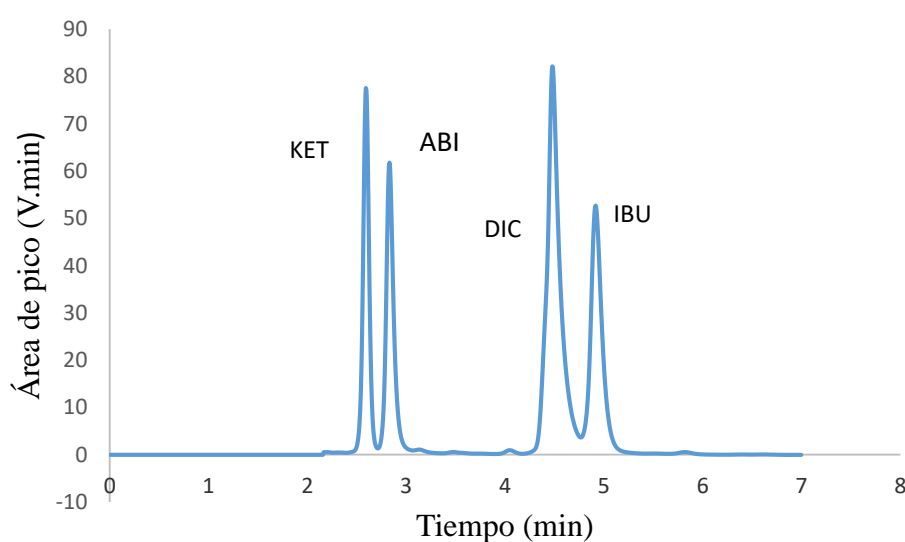


Figura 5. Cromatograma de los distintos analitos a 225 nm.

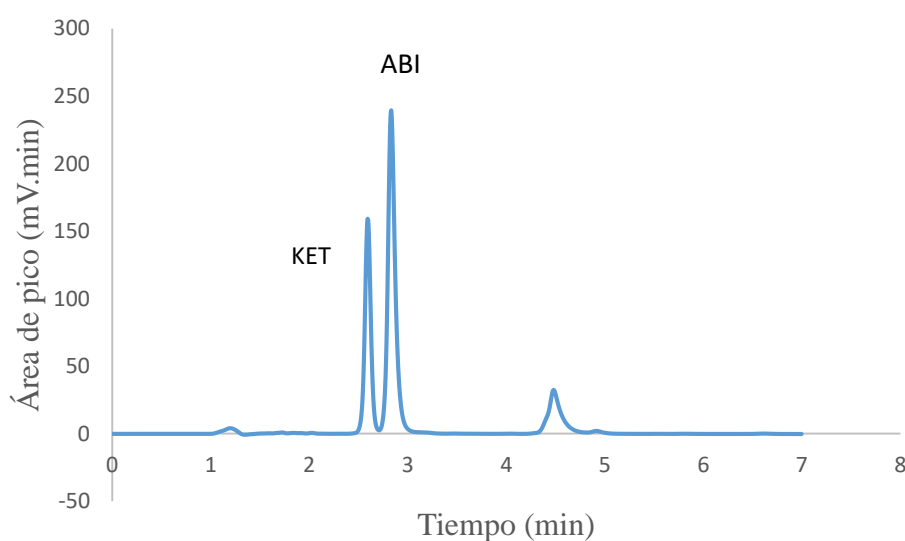


Figura 6. Cromatograma de los distintos analitos a 258 nm.

Lo que se observó que el DIC aparece a una longitud de onda de 225 nm presentando un tiempo de retención (t_R) de 4,41 min (Figura 5), el IBU se observó también a 225 nm a un tiempo de retención de 4,71 min (Figura 5), mientras que el KET y el ABI aparecen a una longitud de 258 nm presentando tiempos de retención de 2,59 min y 2,80 min respectivamente (Figura 6).

4.2. Pruebas previas a la optimización de las condiciones de microextracción en fase sólida dispersiva magnética

4.2.1. Efecto del modo de agitación

La velocidad de agitación afecta a la cinética de la extracción. La agitación mejora la extracción y reduce el tiempo de extracción porque el equilibrio puede lograrse más rápidamente.

El efecto de la agitación se estudió mediante dos métodos: mediante agitación manual durante 10 min y agitación con vortex durante 10 min. Las áreas de pico obtenidas en ambos casos se muestran en la Figura 7.

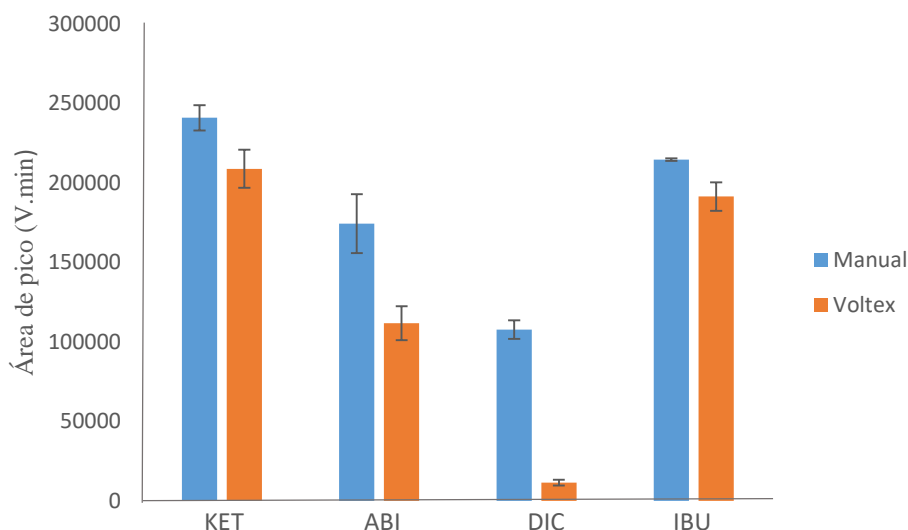


Figura 7. Efecto del modo de agitación. Las barras de error representan la desviación estándar de tres replicados.

Como se puede observar en la Figura 7 el efecto del modo de agitación utilizando agitación manual o utilizando vortex es muy parecido para el KET e IBU, pero hay una diferencia significativa para los otros dos analitos (i.e., ABI y DIC) hay una mayor área

cuando se agita manualmente. Este hecho se puede explicar ya que en vortex las partículas se quedan principalmente en la zona inferior del vial y no se dispersan homogéneamente por todo el vial; como ocurre con la agitación manual.

4.2.2. Tipo de eluyente

La selección del eluyente apropiado para el proceso de extracción es muy importante ya que el disolvente de elución debe proporcionar la máxima eficacia para todos los analitos. Se realizó una extracción por cada eluyente de una disolución patrón de 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de NSAIDs, en la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos.

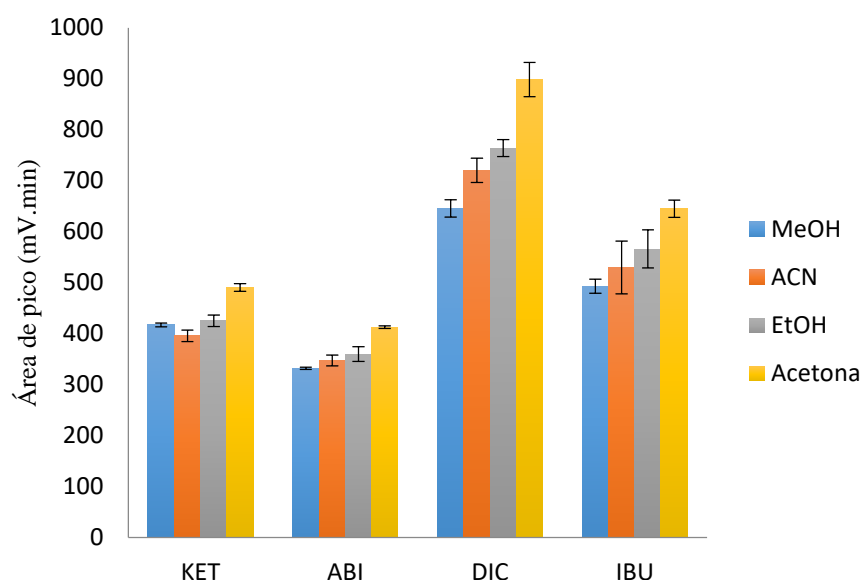


Figura 8. Efecto de los cuatro eluyentes. Las barras de error representan la desviación estándar de tres replicados.

Como se puede ver en la Figura 8 los mejores resultados se obtuvieron utilizando acetona. Sin embargo, el eluyente elegido fue el MeOH por su facilidad en el manejo y separación de fases con ayuda del campo magnético. Con el resto de eluyentes la separación eluato-zeolita no era buena.

4.3 Optimización de las condiciones de microextracción en fase sólida dispersiva magnética

4.3.1 Etapa de cribado

Se utilizó el diseño factorial fraccionado de Plackett-Burman para evaluar las diferentes variables. Como ya se ha comentado anteriormente, el diseño Plackett-Burman consiste en un diseño factorial fraccionado saturado de dos niveles (+1,-1) utilizado para estudiar $k = N - 1$ variables, con N ensayos, siendo N múltiplo de 4.²³ Este diseño asume que las interacciones entre variables pueden ser ignoradas y calcula los efectos principales con un número reducido de experimentos.

En el presente trabajo, se utilizó un diseño saturado de Plackett-Burman para evaluar diferentes variables. Las variables experimentales seleccionadas fueron: pH de la muestra, tiempo de extracción, volumen del eluyente, tiempo de elución y fuerza iónica (% NaCl, w/w) (Tabla 4). Se construyó un plan de experimentos (Tabla 5) incluyendo cinco variables reales y seis variables ficticias estudiados en doce experimentos. Las seis variables ficticias incluidos en el diseño se utilizaron para evaluar la variabilidad del procedimiento a lo largo de los experimentos.^{25,26} Los doce experimentos se realizaron en orden aleatorio generado por un programa de software. Los datos obtenidos se evaluaron mediante ANOVA y los resultados se muestran con los gráficos de Pareto (Figuras 9-12) para cada uno de los analitos. Estos gráficos de Pareto muestran una barra para cada variable y la longitud de cada barra es proporcional a la influencia relativa de esa variable en el procedimiento DMSPME. Además, aquellas barras a la derecha indican un efecto positivo en la respuesta cuando se aumenta el valor de la variable del nivel inferior al nivel superior. Por el contrario, las barras a la izquierda indican un efecto negativo en la respuesta. Asimismo, las barras que superan las líneas verticales de referencia (líneas discontinuas) pueden considerarse significativas con una probabilidad del 95%. Como el diseño de Plackett-Burman es un diseño saturado, las líneas punteadas se calcularon utilizando las variables ficticias que permiten evaluar el error estándar (SE) dado por la Ecuación (1)^{25,26}:

$$(SE) = \sqrt{\frac{\Sigma E_{dummy}^2}{n_{dummy}}} \quad (1)$$

Tabla 4. Variables experimentales y niveles del diseño Plackett-Burman.

| Variables | Código | Nivel | |
|----------------------------|--------|---------------|---------------|
| | | Inferior (-1) | Superior (+1) |
| pH | b1 | 3,2 | 7 |
| Volumen eluyente (mL) | b2 | 0,5 | 1 |
| Tiempo de extracción (min) | b3 | 2 | 10 |
| Tiempo de elución (min) | b4 | 2 | 10 |
| Fuerza iónica(% NaCl, w/w) | b5 | 0 | 5 |

El plan de los 12 experimentos del diseño de Plackett-Burman se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Plan de experimentos del diseño de Plackett-Burman.

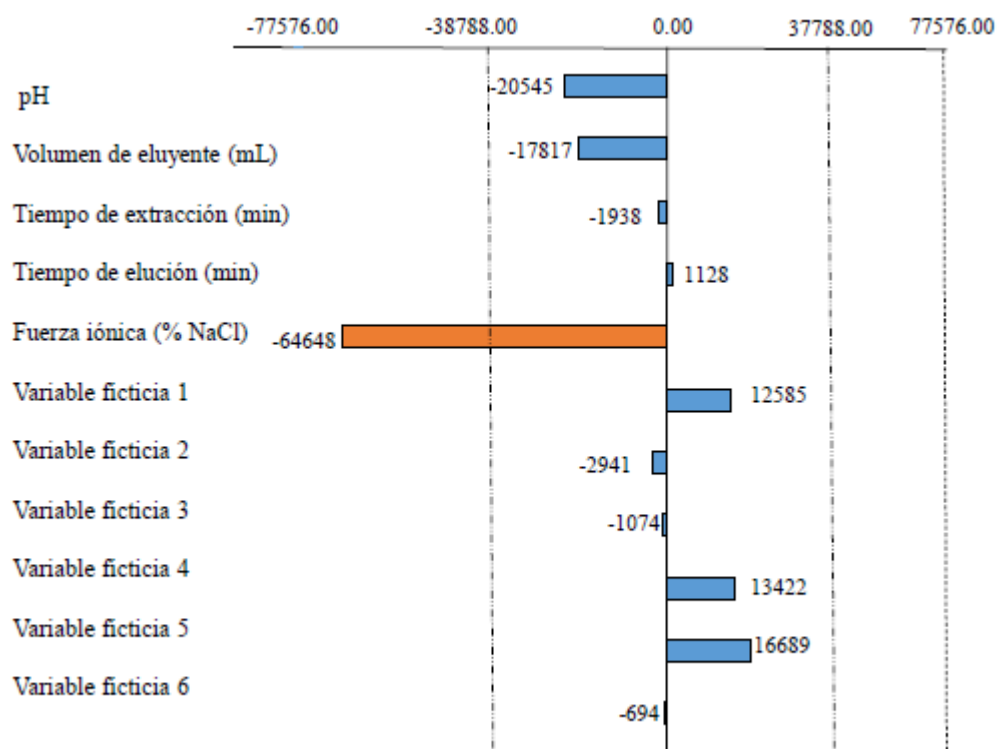
| Nº Exp | Orden | pH | Volumen eluyente (mL) | Tiempo extracción (min) | Tiempo de elución (min) | Fuerza iónica (% NaCl, w/w) |
|--------|-------|-----|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| 1 | 11 | 7 | 1 | 2 | 10 | 5 |
| 2 | 10 | 3,2 | 1 | 10 | 2 | 5 |
| 3 | 9 | 7 | 0,5 | 10 | 10 | 0 |
| 4 | 1 | 3,2 | 1 | 2 | 10 | 5 |
| 5 | 7 | 3,2 | 0,5 | 10 | 2 | 5 |
| 6 | 4 | 3,2 | 0,5 | 2 | 10 | 0 |
| 7 | 2 | 7 | 0,5 | 2 | 2 | 5 |
| 8 | 5 | 7 | 1 | 2 | 2 | 0 |
| 9 | 6 | 7 | 1 | 10 | 2 | 0 |
| 10 | 3 | 3,2 | 1 | 10 | 10 | 0 |
| 11 | 12 | 7 | 0,5 | 10 | 10 | 5 |
| 12 | 8 | 3,2 | 0,5 | 2 | 2 | 0 |

Las respuestas estudiadas en la etapa de cribado fueron las áreas de pico de los cuatro analitos (IBU, KET, DIC y ABI) obtenidas por LC-UV-VIS mostradas en la Tabla 6. Los experimentos se realizaron en orden aleatorio proporcionado por el software para que el operante no condicione el experimento.

Tabla 6. Datos obtenidos de las áreas de pico para el plan de experimentos.

| Nº Exp | Áreas de Pico (V.min) | | | |
|-----------|-----------------------|--------|--------|--------|
| | KET | ABI | DIC | IBU |
| 1 | 19876 | 82155 | 199731 | 39544 |
| 2 | 14185 | 164117 | 276117 | 107377 |
| 3 | 139521 | 118589 | 30037 | 114381 |
| 4 | 21231 | 138658 | 259412 | 87369 |
| 5 | 114163 | 342514 | 431020 | 187632 |
| 6 | 245467 | 258750 | 210175 | 247568 |
| 7 | 18665 | 118997 | 319012 | 63063 |
| 8 | 136845 | 218514 | 316495 | 157076 |
| 9 | 138830 | 216173 | 299242 | 154862 |
| 10 | 157679 | 203536 | 253602 | 150444 |
| 11 | 18538 | 161193 | 366920 | 98873 |
| 12 | 165090 | 130392 | 32657 | 161949 |

A continuación, se muestran los gráficos de paretos obtenidos para los distintos analitos.

**Figura 9.** Gráfico de pareto para el KET obtenido con el diseño Plackett-Burman.

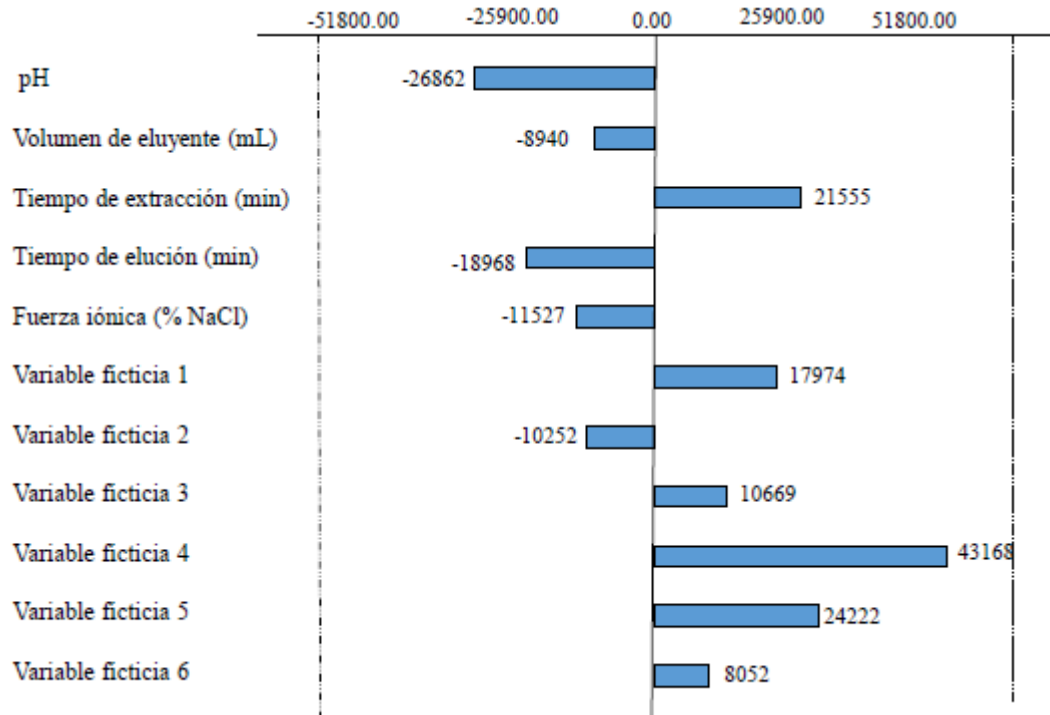


Figura 10. Gráfico de Pareto para el ABI obtenido con el diseño Plackett-Burman.

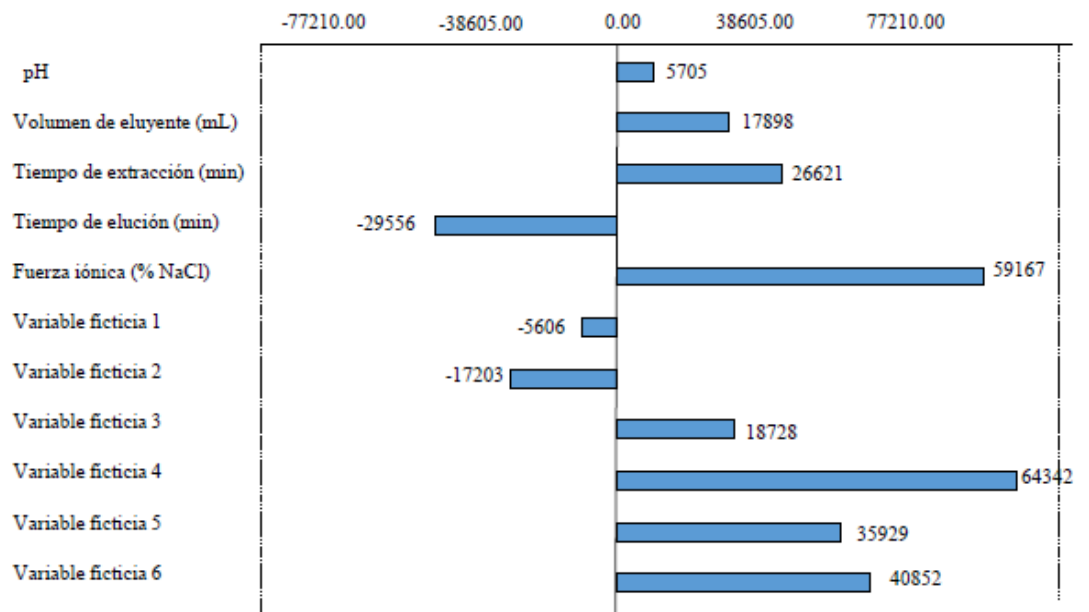


Figura 11. Gráfico de Pareto para el DIC obtenido con el diseño Plackett-Burman.

Resultados y discusión

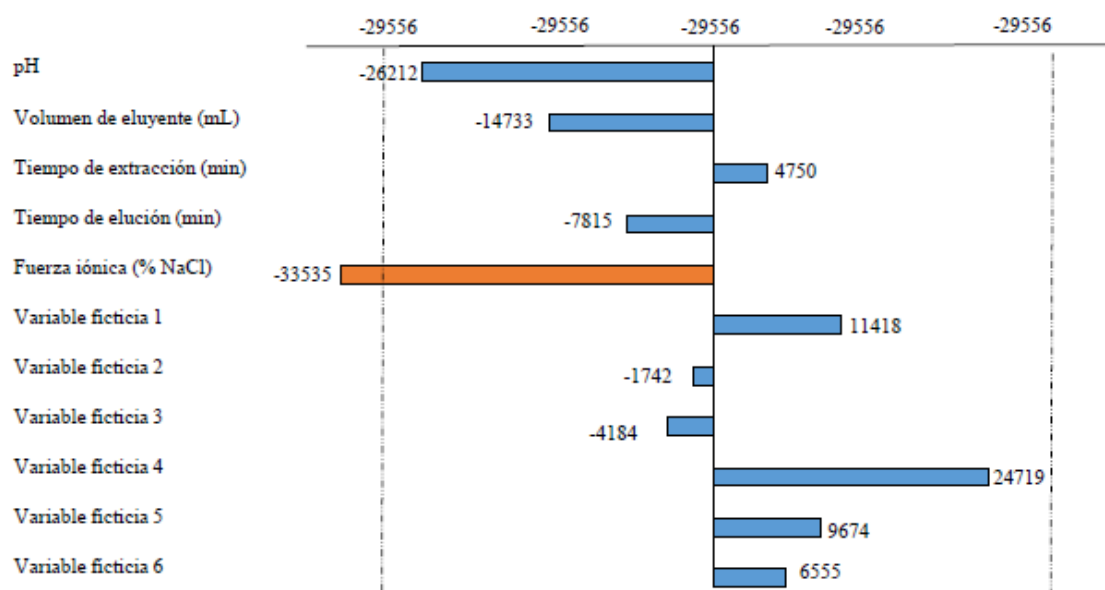


Figura 12. Gráfico de pareto para el IBU obtenido con el diseño Plackett-Burman.

Tal y como se deduce en las figuras 9-12, el pH no fue una variable significativa para ninguno de los analitos, se observó un efecto negativo para tres de los cuatro analitos. Este hecho es debido a que el pH debe ser ajustado de manera que los analitos estén neutros a ese pH, en este caso los analitos están neutros a pH 3,2 ya que sus valores de pK_a son superiores a 4, pero para el DIC se observa un efecto positivo en el factor pH.

El volumen de eluyente tiene un efecto negativo no significativo para tres de los cuatro analitos, esto es debido a que cuando se emplea un volumen menor de eluyente se obtiene una mayor concentración de analito. Al igual que para el efecto del pH, para el volumen de eluyente también se observó un efecto positivo no significativo para el DIC.

El tiempo de extracción no resultó significativo en ningún caso, pero tuvo un efecto positivo para el ABI, IBU y DIC, siendo negativo para el KET, esto se puede explicar ya que es necesario escoger un tiempo de extracción adecuado el cual alcance el equilibrio y se produzca la adsorción, por ello el KET necesita menores tiempo para que se produzca el equilibrio. Esto es debido a su estructura, ya que el grupo carbonilo está conjugado con dos anillos aromáticos haciéndolo más reactivo, por ello necesita menos tiempo para alcanzar el equilibrio.

El tiempo de elución tampoco resultó una variable significativa para ninguno de los cuatro analitos, para el KET se observó un efecto positivo y para los demás analitos se observó un efecto negativo. Este valor negativo puede estar relacionado con que a tiempos largos de elución pueden degradar los analitos.

Solo la fuerza iónica resultó ser una variable significativa, pero solo para el KET y el IBU con efecto negativo. Para el ABI y el DIC tampoco resultó significativa, pero el DIC presentó efecto positivo. Esto se puede justificar por el hecho de que la adición de sal puede restringir el transporte del analito al sorbente de extracción debido a un aumento de la viscosidad de la muestra. Al aumentar la concentración de sal la difusión de los analitos hacia el eluyente se hace más difícil.

Como he comentado anteriormente solo la fuerza iónica fue una variable significativa, mientras que el resto de variables no resultaron significativas al proceso de extracción.

Las figuras anteriores muestran en qué sentido tienden a modificarse las respuestas con los niveles de estas variables, y, por tanto, el nivel más adecuado al que deben ser fijadas.

Cabe comentar que las variables ficticias presentan un valor grande, hecho que es indicativo de que haya un error experimental, aleatorio o sistemático en el diseño. Sin embargo, el diseño fue repetido dos veces y en ambos casos el resultado fue el mismo. Lo que implica que una de las variables estudiadas tuviera un comportamiento discontinuo y los niveles elegidos no fueron los adecuados.

En la Tabla 7 se recogen los niveles óptimos para cada uno de los factores no significativos evaluados mediante el diseño experimental.

Tabla 7. Condiciones óptimas del proceso de extracción de los diferentes analitos.

| Variables | Valor óptimo |
|-------------------------|--------------|
| pH | 3,2 |
| Volumen eluyente (mL) | 0,5 |
| Tiempo extracción (min) | 10 |
| Tiempo de elución (min) | 2 |

La fuerza iónica al ser la única variable significativa fue optimizada en una etapa posterior.

4.3.2 Etapa de optimización

El siguiente paso sería llevar a cabo una optimización de las variables significativas mediante un diseño central compuesto. Sin embargo, en la etapa anterior la fuerza iónica fue la única variable significativa.

Por ello se optimizó la fuerza iónica mediante una optimización univariante.

Resultados y discusión

Para ello se realizaron extracciones de patrones acuosos dopados a $500 \mu\text{g L}^{-1}$ a diferentes concentraciones de NaCl.

Las respuestas estudiadas en esta etapa de optimización fueron las áreas de pico de los diferentes analitos (KET, ABI, DIC e IBU) obtenidas por LC-UV-VIS al igual que en la etapa de cribado. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13.

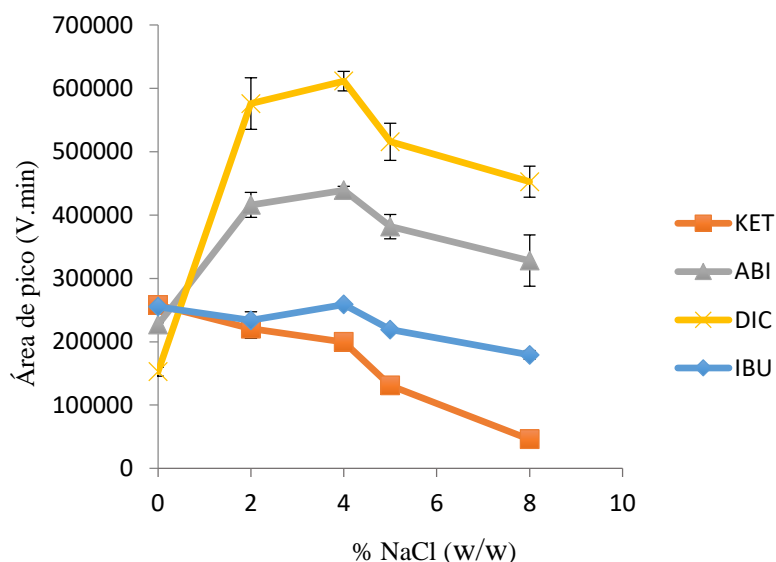


Figura 13. Estudio de la fuerza iónica. Las barras de error representan la desviación estándar de tres replicados.

Como se puede observar en la Figura 13 el valor óptimo de la fuerza iónica para el KET es distinto que para el resto de los analitos, siendo para el KET 0% NaCl y para el resto 4% NaCl.

Con el objetivo de encontrar unas condiciones únicas para los cuatro analitos se realiza un autoescalado. A menudo existen diferentes valores absolutos de las variables, así como diferentes rangos de variables (varianzas). Ambos tipos de distorsiones afectarán a la mayoría de los métodos multivariados. La eliminación de estas diferencias puede llevarse a cabo escalando los datos a rangos y variantes similares, esto es lo que se conoce como autoescalado.

Para ello se ha utilizado la ecuación 2:

$$X_{ik}^* = \sum \frac{X_{ik} - X_{k(\min)}}{X_{k(\max)} - X_{k(\min)}} \quad (2)$$

A continuación, se muestra en la Figura 14 el valor óptimo obtenido para la fuerza iónica.

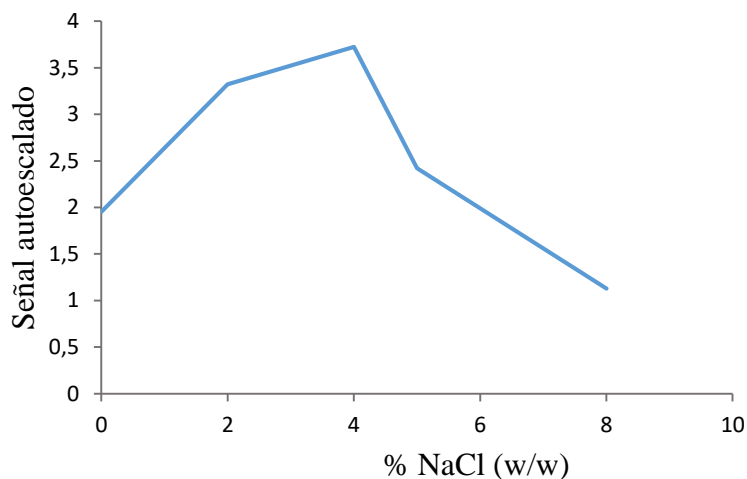


Figura 14. Valor óptimo de la variable fuerza iónica.

El valor óptimo para la variable fuerza iónica estudiada en el proceso de extracción fue de 4% NaCl como se puede ver en la Figura 14.

4.4 Parámetros analíticos

Una vez conocidas las condiciones óptimas de extracción se procede a evaluar el método. Para ello, en primer lugar se realizaron extracciones blanco para estudiar el límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de la recta de calibrado.

El LOD y LOQ se calculan mediante las siguientes ecuaciones.^{27,28}

$$\text{LOD} = \frac{y_B + 3s}{b} \quad (3)$$

$$\text{LOQ} = \frac{y_B + 10s}{b} \quad (4)$$

Tabla 8. Límites de detección y cuantificación para los analitos estudiados.

| Analito | LOD | LOQ |
|---------|-----|-----|
| KET | 1,5 | 5 |
| ABI | 1,5 | 5 |
| DIC | 1,5 | 5 |
| IBU | 1,5 | 5 |

Resultados y discusión

Una vez obtenidos los LOD y LOQ se estudió la linealidad del método y para ello, se realizaron extracciones de diferentes disoluciones patrón las cuales contenían los cuatro NSAIDs (5, 25, 50, 100 y 150 $\mu\text{g L}^{-1}$). El primer punto de la recta es el LOQ.

Las rectas de calibrado obtenidas para cada NSAIDs se muestran en la siguiente Figura.

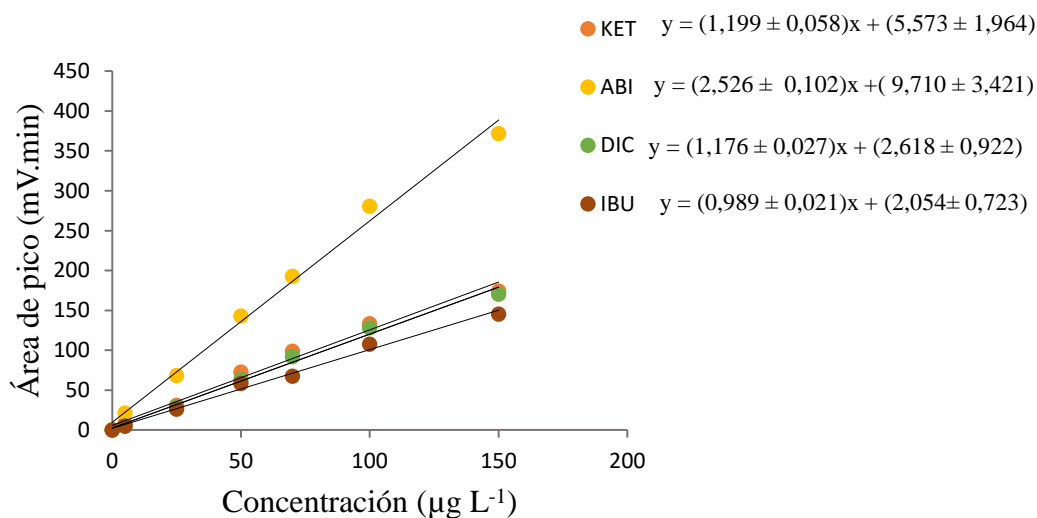


Figura 15. Rectas de calibrado de los analitos registradas a dos longitudes de onda (KET, ABI a 258 nm y DIC e IBU a 225 nm).

Como se puede observar en la figura anterior el intervalo estudiado para los cuatro analitos ha sido lineal siendo el coeficiente de correlación obtenido para cada NSAIDs: KET (0,993), ABI (0,996), DIC (0,995) y IBU (0,996).

También se evaluó la repetibilidad, para ello se realizó tres extracciones a 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ y se calculó el coeficiente de variación (CV). Los resultados obtenidos fueron 3,04%; 3,03%; 0,73% y 0,5% para el KET, ABI, DIC e IBU respectivamente.

4.5 Muestras reales

La determinación de NSAIDs como ya se ha comentado en la introducción es de gran interés hoy en día. Investigaciones recientes han demostrado que estos compuestos tienen efectos adversos a largo plazo tanto para los seres humanos como para los organismos acuáticos, es por ello que existe una gran preocupación por el impacto al medioambiente.

En este trabajo se han analizado dos muestras de agua de diferente procedencia. Una muestra de agua embotellada, y una muestra de agua de la red local.

Las muestras fueron analizadas siguiendo el método desarrollado y las señales fueron inferiores al LOD.

A continuación, se realizaron extracciones de las muestras de agua dopadas a dos niveles de concentración (30 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$). Los resultados de las recuperaciones relativas se muestran en la tabla 9. Las recuperaciones relativas se calculan mediante el cociente del área de la muestra real entre el área de una muestra de agua desionizada, siendo ambas muestras sometidas al proceso de extracción.

Tabla 9. Recuperaciones relativas (%) de las muestras de agua.

| | Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Recuperación relativa (%) | | | |
|------------------|---|---------------------------|-----|-----|-----|
| | | KET | ABI | DIC | IBU |
| Agua embotellada | 30 | 113 | 93 | 97 | 77 |
| | 100 | 103 | 102 | 81 | 77 |
| Agua red local | 30 | 106 | 44 | 19 | 47 |
| | 100 | 48 | 23 | 15 | 43 |

Observando los datos del factor de recuperación para el agua embotellada se puede concluir que no hay efecto de matriz, ya que el factor de recuperación debe de estar entre 70-80% el límite inferior y 110-120% el límite superior.

Por otro lado, el agua de la red local analizada presentó efecto de matriz, para ello debería emplearse el método de calibración de adición estándar para su correcto análisis.

5. CONCLUSIÓN

En este trabajo se ha desarrollado un método para la determinación simultánea de NSAIDs en muestras de agua, ya que estos compuestos farmacéuticos son hoy en día una gran preocupación para el medio ambiente, así como para la salud del ecosistema y sobre todo el impacto en el suministro de agua potable ya que podría afectar a la salud humana.

Se ha empleado la técnica de microextracción en fase sólida dispersiva magnética, ya que presenta ventajas, además es una técnica rápida, sencilla, de fácil manejo y presenta elevados factores de preconcentración. En ella se ha usado HDTMABr-ZSM-5/Fe₂O₃ como sorbente ya que presenta buenas propiedades, son buenos intercambiadores iónicos y además tienen una gran área superficial. Posteriormente estos analitos se ha identificado mediante cromatografía de líquidos con detección UV-VIS.

El método se ha optimizado mediante un diseño estadísticos de experimentos el cual permite evaluar las variables para encontrar su valor óptimo reduciendo el número de experimentos de muestra, de sorbente y de tiempo.

Una vez obtenidos los valores óptimos se validado el método y aplicado a muestras reales, siendo estas agua embotellada y agua de la red local. Presentado buenas recuperaciones relativas para el agua embotellada. En el agua de la red local se observó efecto de matriz.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Carmona Moreno, A. D. Estudio de absorción de Antiinflamatorios no Esteroidales en Plantas de Trigo y adsorción en Suelos de la Región Metropolitana. Tesis doctoral, Universidad de Chile, 2012.
- (2) Rivera-Ordoñez, A. *Rev. Mex. Anesthesiol.* **2006**, 29, 36–40.
- (3) Hall Ramirez, Victoria; Murillo Porras, Natalia; Rocha Plama, Milania; Rodriguez Vega, E. *Cent. Nac. Inf. Medicam. Inst. Investig. Farm.* **2001**, 53.
- (4) Azzouz, A. Automización y simplificación de las etapas de preparación de muestras para la determinación de sustancias farmacológicamente activas en matrices ambientales, alimentarias y biológicas. Tesis doctoral, Universidad de Jaén, Abril de 2003.
- (5) Khezeli, T.; Daneshfar, A. *Development of dispersive micro-solid phase extraction based on micro and nano sorbents*; Elsevier: Iran, 2017.
- (6) Liska, I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis-historical development and overview *J. Chromatogr. A* **2000**, 885, 3–16.
- (7) Pérez Almiñana, V. D. *Muestreo y preparación de la muestra*; Síntesis: Madrid, 2014.
- (8) Dimpe, K. M.; Nomngongo, P. N. Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2016**, 82, 199–207.
- (9) Wierucka, M.; Biziuk, M. Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2014**, 59, 50–58.
- (10) Moreno González, D. Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de residuos de carbamatos en alimentos y aguas. Tesis doctoral, Universidad de Granada, Abril de 2003.
- (11) Galán Cano, F. Innovaciones en técnicas de extracción miniaturizadas. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, Marzo de 2013.
- (12) Song, X.-Y.; Chen, J.; Shi, Y.-P. Different configurations of carbon nanotubes reinforced solid-phase microextraction techniques and their applications in the environmental analysis *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, 86, 263–275.
- (13) Pena-Pereira, F. *Miniaturization in sample preparation*; De Gruyter Open: Vigo, 2014.

Bibliografía

- (14) Anastassiades, M; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D; Schenck, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce *J. AOAC Int.* **2003**, 86, 20.
- (15) Castillo-García, M. L.; Aguilar-Caballeros, M. P.; Gómez-Hens, A. Nanomaterials as tools in chromatographic methods *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2016**, 82, 385–393.
- (16) Anderson, Jared L; Berthod Alain; Pino Estévez, Verónica; Stalcup, A. M. *Analytical Separation Science*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2015.
- (17) Jiménez Díaz, I. Desarrollo de metodología analítica para la determinación de tensoactivos y sus productos de degradación mediante diferentes técnicas separativas. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Febrero de 2009.
- (18) Gomez Martin, J. M. Síntesis, caracterización y aplicaciones catalíticas de zeolitas básicas. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Mayo de 2001.
- (19) Kulprathipanja, S. *Zeolites and industrial separation and catalysis*, 1 st ed.; Weinheim, W.-V; Germany, 2010.
- (20) Costafreda Mustelier, J. L. *Tectosilicatos con características especiales: Las zeolitas naturales*; Fundación Gómez Pardo: Madrid, 2014.
- (21) Structure Commission of the international Zeolite Association <http://www.iza-structure.org/>.
- (22) Fernández, E.; Vidal, L.; Canals, A. Zeolite/iron oxide composite as sorbent for magnetic solid-phase extraction of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes from water samples prior to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2016**, 1458, 18–24.
- (23) Montgomery, D. *Diseño y análisis de experimentos*; Wiley, L., Ed.; Arizona, 2004.
- (24) H. Myers, R.; C. Montgomery, D.; Vining, G. G.; M. Borror, C.; M. Kowalski, S. Response Surface Methodology: A Retrospective and Literature Survey. *J. Qual. Technol.* **2004** 36 (1), 53.
- (25) Heyden, Y. V.; Hartmann, C.; Massart, D. L.; Michel, L.; Kiechle, P.; Erni, F. Ruggedness tests for a high-performance liquid Chromatographic assay:

- Comparison of an evaluation at two and three levels by using two-level Plackett-Burman designs *Anal. Chim. Acta* **1995**, 316 (1), 15–26.
- (26) Fabre, H.; Mesplet, N. Robustness testing for a capillary electrophoresis method using the "short-end injection" technique. *J. Chromatogr. A* **2000**, 897, 329–338.
- (27) Miller, J. M. J. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*; Prentice Hall: Madrid, 2002.
- (28) Morillas, P.P; y colaboradores. *Guía Eurachem: La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos*, Guía Eurac: 2016.

